



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

O Amido Resistente no pão

Soraia Filipa Cândido Guerreiro

Beja

2015

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia Alimentar

O Amido Resistente no pão

**Dissertação de mestrado apresentada na Escola Superior Agrária do
Instituto Politécnico de Beja**

Elaborado por:

Soraia Filipa Cândido Guerreiro

Orientado por:

Dr^a Olga Maria Reis Pacheco de Amaral, Professora Adjunta

Beja

2015

À minha família e marido

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao contributo de diversas pessoas e instituições a quem quero manifestar o meu agradecimento.

À Dr^a Olga Amaral, orientadora desta dissertação, um muito obrigada pelos seus ensinamentos, pela sua disponibilidade, pelas suas sugestões, pelo apoio e valiosa ajuda em todo o processo de elaboração deste trabalho.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, pela possibilidade que me concedeu de aí realizar o trabalho experimental relativo a esta tese.

Ao pessoal docente de laboratório que em muito me ajudou na realização do trabalho prático, muito obrigada pelo apoio demonstrado.

Aos meus colegas de trabalho pelo apoio durante esta reta final, um muito obrigada às minhas chefes pelo ajuda e flexibilidade horária nesta fase difícil.

À minha família, pais, avós, tia e irmã, não tenho como agradecer o suficiente pelo apoio demonstrado desde o início desta aventura, por nunca me terem deixado desistir e pelo suporte que foram durante a execução deste trabalho.

Ao Daniel Freitas, meu marido, pelo amor, carinho, apoio e ajuda que me dedicou ao longo de todo este tempo e principalmente nesta reta final.

A todos **MUITO OBRIGADA**, sem vocês nada disto seria possível!

Resumo

Alguns alimentos podem constituir um fator de proteção adicional no desenvolvimento de doenças crônicas, não transmissíveis. O amido resistente definido como a soma do amido e produtos da sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis tem demonstrado possuir propriedades fisiológicas que lhe conferem efeitos protetores para determinadas doenças, nomeadamente doenças intestinais, diabetes, doença cardiovascular, dislipidemias, obesidade e osteoporose.

Este trabalho teve como objetivos determinar o teor de Amido Resistente em diferentes variedades de pão, tão diferentes quanto possível, à venda no mercado português e determinar o efeito da conservação durante 7 dias à temperatura ambiente e embalado a vácuo.

Neste trabalho foram analisadas 6 amostras de pão, nomeadamente, pão de trigo, pão de mistura (trigo + centeio), pão integral, broa de milho, pão com sementes e pão com aveia e cevada relativamente ao teor de humidade e ao teor de amido resistente.

A análise dos resultados permite concluir que a amostra que tem maior concentração de AR ($P < 0,05$) é a broa de milho quer aos 0 dias quer aos 7 dias. A conservação durante 7 dias à temperatura ambiente e embalado a vácuo induz um aumento do teor de AR embora não seja estatisticamente significativo. Após os 7 dias de conservação o pão apresenta desenvolvimento de bolores o que o torna impróprio para consumo. O consumo de AR diário pelos Portugueses proveniente da ingestão de pão e caso a escolha seja broa de milho estima-se que será de 2,74 g/dia.

Palavras chave – Amido Resistente, pão, retrogradação, amido e conservação.

Abstract

Some foods may present a protection factor regarding the development of some chronic diseases. The resistant starch is defined as the sum of starch, and products resulting from its degradation that are not absorbed in the small intestine of healthy individuals. This fact grants properties to the RS that result in a protection factor against intestine diseases, diabetes, coronary diseases, obesity, osteoporosis, Dyslipidemia.

The objectives of this work were to determine the grade of resistant starch in different varieties of bread. The samples of bread had to be as much different as possible from one another, and be available for the consumers in Portuguese markets.

The effects of conservation in vacuum storage at room temperature during the 7 days were determined for the breads in the study. In this study 6 bread samples were analysed, regarding the humidity and resistant starch levels; Brown bread (rye and wheat), wheat bread, whole grain bread, corn bread, bread with seeds, bread with oats and barley.

Through the analysis of the results, it was concluded that the sample presenting the highest concentration of RS ($P < 0,05$) is corn bread, this fact was observed from day one to the 7th day of the study. Signs of some evolution were denoted, however, the small increase in R.S. concentration levels that were shown by the majority of the samples during the 7 day period were not statistically significant and it was probably the result of the storage conditions. Also, after the 7 day period, growth of mould inside the container for the samples (stored in vacuum), was observed, due to this fact the bread was not good for human consumption.

According to our results, calculations and taking into account the value of daily bread consumption by the Portuguese, if the corn bread is the chosen to consume, the estimated value will be 2,74 g/ daily of RS for person.

Keywords: Resistant Starch, bread, retrogradation, starch and conservation.

Índice geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice geral	IV
Índice de tabelas	VI
I. Revisão Bibliográfica	1
1. Introdução e objetivos.....	1
2. Alimentos Funcionais	3
3. Fibra Alimentar	4
4. Amido	6
5. Amido Resistente.....	8
6. Tipos de Amido Resistente	8
7. Fatores que influenciam o teor de AR nos alimentos	10
8. Aplicações do Amido Resistente	11
9. Benefícios fisiológicos do consumo de AR	12
10. Amido Resistente e índice glicêmico.....	14
II. Trabalho Experimental	16
1.Descrição do trabalho	16
2. Materiais e métodos	17
2.1. Amostragem	17
2.2. Determinações analíticas	19
2.2.1. Determinação da Humidade	19
2.2.2. Determinação do Amido Resistente	22

2.2.3. Cálculos.....	27
2.3. Tratamento Estatístico	27
3. Resultados e Discussão	28
3.1. Consumos diários de Amido Resistente	35
4. Conclusões	37
III. Perspetivas Futuras	38
Referências Bibliográficas.....	39

Índice de tabelas

Tabela nº 1- Teor em fibra de farinhas provenientes de diversos cereais.	6
Tabela nº 2 – Plano de ensaios	16
Tabela nº 3 – Informação relevante sobre as amostras.....	17
Tabela nº 4 – Teor de humidade e de AR das diferentes amostras analisadas aos 0 dias de conservação	28
Tabela nº 5 – Comparação das médias da concentração de AR (g/100 de peso seco) das amostras aos 0 dias pelo Teste de Duncan.	29
Tabela nº 6- Teor de humidade e de AR das diferentes amostras analisadas aos 7 dias de conservação	31
Tabela nº 7 – Comparação das médias da concentração de AR (g/100 de peso seco) das amostras aos 7 dias pelo Teste de Duncan.	32
Tabela nº 8 – Consumos diários de AR dos vários tipos de pão que constituem a amostra analisada.	35

I. Revisão Bibliográfica

1. Introdução e objetivos

Atualmente assistimos a rápidas alterações na alimentação e no estilo de vida do Homem, em especial nos países desenvolvidos e nos países em transição, como resultado da industrialização, do urbanismo, do desenvolvimento económico e dos mercados globais. Devido a estas rápidas e drásticas alterações do padrão alimentar e dos hábitos de vida, as doenças crónicas não transmissíveis, tais como obesidade, diabetes *mellitus*, doença cardiovascular, hipertensão, acidente vascular cerebral e alguns tipos de cancro, tornaram-se a maior causa de morbilidade e morte prematura (WHO, 2003).

Alguns alimentos podem constituir um fator de proteção adicional no desenvolvimento destas doenças crónicas - os alimentos funcionais. Estes alimentos, para além de satisfazerem as necessidades nutricionais básicas, contêm uma ou mais substâncias fisiologicamente ativas, que em quantidade suficiente e adequada, promovem a saúde e o bem-estar e podem ser associadas à redução de fatores de risco no desenvolvimento de doenças crónicas (Figueira, 2010; Sanchez, 2009)

O pão é um dos alimentos base da dieta dos Portugueses. Segundo o estudo EPIPorto, cerca de 96% da população refere ingerir pão diariamente (Lopes *et al.*, 2006). Segundo Borczak, Sikora, Sikora e Kapusta-Duch (2014), o pão é também uma das principais fontes de hidratos de carbono complexos na nutrição humana. Também os resultados do inquérito Nacional de Saúde 2005/2006 referem a presença de pão em 90% das refeições principais e em 50% das pequenas refeições da população portuguesa (Instituto Nacional de Estatística & Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2009). Do ponto de vista nutricional o pão fornece hidratos de carbono (sobretudo amido), fibra, algumas vitaminas e alguns sais minerais.

Antes da década de 80, era assumido que todo o amido ingerido era hidrolisado e absorvido no intestino delgado. Estudos então realizados revelaram que uma parte do amido ingerido não é hidrolisado e resiste ao processo digestivo. Esta fração denominou-se Amido Resistente (AR) e foi definido como a soma do amido e produtos da sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis (Sajilata, Singhal & Kulkarni, 2006).

Têm sido atribuídas ao AR propriedades fisiológicas que lhe conferem efeitos protetores para determinadas doenças, nomeadamente doenças intestinais, diabetes, doença cardiovascular, dislipidemias, obesidade e osteoporose (Basso, 2010; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Walter, Silva & Emanuelli, 2005; Zhang, Zang, Wang, Zeng & Zheng, 2014).

O AR é hidrolisado, no cólon, pelas amilases bacterianas a glicose que, por sua vez, sofre fermentação resultando dióxido de carbono, metano, hidrogénio e ácidos gordos de cadeia curta (AGCC). Estes incluem butirato, acetato e propionato, e pensa-se serem estes os responsáveis pelos efeitos benéficos atribuídos ao AR (Nugent, 2005). Além destes efeitos atribuídos aos AGCC, a evidência demonstra também a existência de propriedades prebióticas do AR (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011) e alguns estudos apontam também para a possibilidade de alimentos ricos em AR induzirem maior saciedade (Higgins, 2004).

O AR tem sido alvo do interesse dos investigadores, pelas suas propriedades funcionais, (Sajilata *et al.*, 2006), tendo sido inclusive recentemente reconhecido pela European Food Safety Authority (EFSA) como ingrediente funcional (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011).

Durante o processamento, os alimentos ricos em amido sofrem modificações físicas que influenciam o teor final de AR. Exemplo disso é o calor húmido, que na maioria dos casos, favorece a formação de AR. Em particular, no fabrico do pão o cozimento a temperaturas mais baixas durante mais tempo origina teores mais elevados de AR. O teor deste nutriente aumenta ainda ao longo da conservação, especialmente a baixas temperaturas (Sajilata *et al.*, 2006; Yadav, 2011).

Este trabalho teve como objetivos determinar o teor de AR em diferentes variedades de pão, tão diferentes quanto possível, à venda no mercado português e determinar o efeito da conservação durante 7 dias à temperatura ambiente e embalado a vácuo.

Não foram encontrados, na bibliografia disponível, quaisquer valores do teor de AR dos pães disponíveis no mercado português, nem estimativas da quantidade diária de AR ingerida pela população portuguesa. Este trabalho poderá contribuir para o conhecimento do teor de AR das diferentes variedades de pão disponíveis para o consumidor, do efeito da conservação à temperatura ambiente na concentração deste componente e ainda fazer uma estimativa do consumo de AR proveniente do pão pela população portuguesa.

2. Alimentos Funcionais

A noção de que o consumo de alimentos pode trazer benefícios para a saúde é bastante antigo e já Hipócrates, há 2500 anos, declarou: “que o alimento seja a tua medicina e que o medicamento seja o teu alimento” (Milner, 1999 como citado em Carvalho & Santos 2009).

Este conceito foi recuperado no Japão na década de 80 e foi marcado pela publicação de Regulamentação sobre alimentos para uso específico na saúde. Este conceito diz respeito a alimentos processados que contêm substâncias ou nutrientes que desempenham um papel específico nas funções fisiológicas do organismo humano, para além do seu conteúdo nutricional (Wilkinson *et al.*, 2004 como citado em Oliveira & Cardoso, 2009; Henry, 2010; Ferrão, 2012).

Os alimentos funcionais não têm uma definição universalmente aceite. Todos os alimentos são funcionais em certa medida, uma vez que providenciam, valor nutritivo, aroma e sabor. Assume-se, no entanto, que um alimento adquire estatuto de alimento funcional se originar efeitos fisiológicos benéficos para a saúde, no que respeita especificamente à redução do risco de desenvolvimento de doença ou à otimização de uma situação de saúde, para além da sua função básica nutritiva (Carvalho & Santos, 2008; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011).

Os consumidores dos países mais desenvolvidos estão cada vez mais conscientes da relação existente entre um estilo de vida saudável (onde se incluem bons hábitos alimentares) e a sua saúde. Entre as principais preocupações com a saúde destacam-se as doenças cardiovasculares, a pressão arterial elevada, o cancro e a obesidade (Van-Kleef *et al.*, 2005 como citado em Carvalho & Santos, 2009).

Não há dúvida de que o interesse japonês por alimentos funcionais trouxe também a consciencialização da necessidade de tais produtos na Europa (Henry, 2010). Os especialistas perceberam que estes alimentos além de ajudarem a reduzir o custo dos cuidados de saúde associados ao envelhecimento da população, representam também uma enorme potencialidade para a indústria alimentar (Menrad, 2003 como citado em Franco, 2006).

O desenvolvimento de um produto funcional apresenta vários pontos críticos, entre os quais a demonstração da sua bioeficácia. Os alimentos funcionais possuem, na sua composição, substâncias biologicamente ativas que, ao serem introduzidas na alimentação comum, modulam processos metabólicos ou fisiológicos, auxiliando na

redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e na manutenção da saúde (Roberfroid, 2002 como citado em Franco, 2006).

Os prebióticos constituem um grupo importante de produtos funcionais. Trata-se de oligossacáridos e polissacáridos não digestíveis (onde se inclui o AR) que podem beneficiar o organismo de várias maneiras: por estimularem o crescimento de microrganismos no cólon, por aumentarem a sensação de saciedade e ajudarem dessa forma na prevenção da obesidade e ainda, por contribuírem para a regulação dos níveis de glicose sanguínea (Siró *et al.*, 2008 as como citado em Carvalho & Santos, 2009).

3. Fibra Alimentar

A definição de fibra alimentar tem sido objeto de muita discussão e controvérsia (Asp, 2004 como citado em Cummings *et al.*, 1997; Nugent, 2005). A fibra dietética tanto é considerada como um resíduo, como um “remédio universal” que melhora qualquer problema fisiológico no organismo humano. Contudo, nenhum dos pontos de vista é completamente verdade, sabe-se que as fibras alimentares têm um papel importante em muitos processos fisiológicos e na prevenção de doenças e que para além disso, durante os últimos anos, têm sido referidas e utilizadas como ingrediente funcional (Rodríguez *et al.*, 2006).

A fibra alimentar é um conjunto heterogéneo de compostos de difícil quantificação analítica, incluídos no grupo dos hidratos de carbono (Amaral, 2015; Westenbrink, Brunt & Kamp, 2013).

Segundo a American Association of Cereal Chemists (AACC) as fibras alimentares são as partes comestíveis das plantas ou hidratos de carbono análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lenhina e substâncias vegetais associadas (Cumming & Stephen, 2007).

A definição mais recente de fibra alimentar inclui os polissacarídeos não digeridos nem absorvidos pelo intestino delgado humano que pertencem a uma das seguintes categorias: - presentes naturalmente nos alimentos; - extraídos de produtos alimentares por processos físicos, enzimáticos ou químicos; - obtidos por síntese (Comission CA, 2009 como citado em Amaral, 2015). Em relação aos oligossacáridos

resistentes, a Comissão Europeia decidiu incluir também este grupo na definição de fibra alimentar (European Commission, 2008 como citado em Amaral, 2015).

A não-digestibilidade da fibra alimentar no intestino delgado é uma característica fisiológica de fundamental importância para este componente. Por isso, definições recentes de fibra alimentar englobam, além dos polissacarídeos não amiláceos, outros hidratos de carbono não digeríveis, como o amido resistente e oligossacarídeos não digeríveis (Martinho, 2011).

As fibras alimentares promovem efeitos fisiológicos benéficos, como ação laxante, diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol, diminuição da glicemia posprandial, previnem e tratam a doença diverticular do cólon, reduzem o risco de cancro e melhoram o controlo da diabetes *mellitus* (Brunt & Kamp, 2013; Matsuda, 2007; Mattos & Martins, 2000; Nugent, 2005; Sanchez, 2009; Westenbrink *et al*, 2013).

Entre os diferentes alimentos ricos em fibra, os cereais são uma das principais fontes, contribuindo em cerca de 50% do consumo de fibra nos países ocidentais. Dos vegetais provêm 30-40% das fibras alimentares, das frutas 16% e os restantes 3% de outras fontes secundárias (Cummings *et al.*, 1997). A quantidade de fibra dietética proveniente dos cereais é muito variável e depende da espécie de origem e da transformação que sofreu. O conteúdo de fibra alimentar na farinha de trigo varia desde 2,5 g/100 g para a farinha refinada, até 12 g/100 g na farinha não refinada (a maioria de fibra é a fração insolúvel que é perdida durante o processo de refinação) (Rodríguez *et al.*, 2006). A tabela 1 representa valores do teor em fibra de diversas farinhas (Martinho, 2011).

Tabela nº 1- Teor em fibra de farinhas provenientes de diversos cereais

Tipo de Farinha	g de fibra/ 100g produto
Milho tipo 70	2,6
Trigo tipo 55	2,9
Trigo tipo 150	3,7
Alfarroba	5,0
Centeio tipo 70	7,0
Trigo integral	8,6
Centeio tipo 85	11,7

4. Amido

O amido constitui a principal fonte de hidratos de carbono na alimentação humana, representando cerca de 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta. É o principal responsável pelas propriedades tecnológicas, que caracterizam grande parte dos produtos processados e apresenta grande importância nutricional e industrial. Encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como hidratos de carbono de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos (Basso, 2010; Walter, 2005; Fuentes-Zaragoza, 2010).

Quimicamente o amido é um polissacarídeo composto por unidades de glicose. Pode organizar-se em dois tipos de estruturas, a amilose que consiste em cadeias lineares $\alpha(1-4)$ de aproximadamente 1000 unidades; e a amilopectina que é constituída por cadeias lineares $\alpha(1-4)$ com ramificações $\alpha(1-6)$ e que pode chegar a 4000 unidades de glicose. De forma geral, a amilopectina é o maior constituinte enquanto a amilose constitui entre 15 a 30% do teor de amido total (Belitz *et al*, 2009 como citado em Amaral, 2015).

Na planta, o amido é armazenado como grânulos intracelulares parcialmente cristalinos, (15 a 45% de cristalinidade). Por meio de difração de raios X podem distinguir-se três tipos de grânulos que, dependendo da sua forma e estrutura cristalina, denominam-se A, B e C (Cereda *et al.*, 2001; Zobel, 1988 como citado em Polesi, 2009).

O aquecimento do amido na presença de água em excesso promove a expansão e a solubilidade dos grânulos. O calor faz com que os grânulos inchem e expandam e a amilose difunde-se para a fase aquosa, entre os grânulos, causando aumento crescente da viscosidade. De seguida dá-se a rutura da estrutura granular, resultando uma solução de amilose e amilopectina. O inchaço, a hidratação e solubilização das moléculas de amido no seu conjunto definem o processo de gelatinização. Com o arrefecimento da pasta de amido, após a sua gelatinização, as cadeias do amido perdem energia fazendo com que, em especial as moléculas de amilose, apresentem tendência para se associarem por pontes de hidrogénio com moléculas de amilose adjacentes, formando estruturas ordenadas, cujo processo é conhecido como retrogradação (Bello-Pérez, Montealvo & Acevedo, 2006; Hosney, 1994 como citado em Polesi, 2009; Polesi, 2011).

O amido é potencialmente digerível pelas enzimas amilolíticas segregadas no sistema digestivo humano, pois apresenta somente ligações α -glicosídicas (Englyst & Hudson, 1996 como citado em Polesi, 2011). No entanto, o amido apresenta digestibilidade variada e, pode mesmo não ser digerido pelo organismo. O amido pode ser classificado dependendo da velocidade com que é digerido *in vitro* (incubação com amilase pancreática e amiloglucosidase a 37°C) em:

- amido rapidamente digerível (ARD), quando digerido em 20 minutos;
- amido lentamente digerível (ALD), quando digerido entre 20 e 120 minutos e
- amido resistente (AR), quando resiste à ação das enzimas digestivas após 120 minutos (Lobo & Silva, 2003; Polesi, 2011; Jun, Lee, Lee & Lee, 2014).

O AR define-se como a soma do amido e dos produtos da sua degradação que não são absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis (Fontinha & Correia, 2010; Goñi, García-Diz, Mañas & Saura-Calixto, 1996; Murphy, Douglas & Birkett, 2008; Mendes, 2011; Nugent, 2005; Polesi, 2009; Sanchez, 2009).

5. Amido Resistente

A partir da década de 80, aumentou o interesse dos investigadores por esta fração do amido que escapa à digestão no intestino delgado e chega ao cólon, onde serve de substrato energético para a flora bacteriana aí existente. Essa fração, denominada **amido resistente**, parece apresentar determinados efeitos fisiológicos, inicialmente imputados apenas às fibras alimentares. (Lobo & Silva, 2003; Basso, 2010; Jun *et al.*, 2014, Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010).

O amido resistente é bem tolerado, com um limite de ingestão que pode chegar até aos 30 g por dia sem provocar efeitos colaterais, como inchaço, flatulência, efeitos laxantes e dores de estômago, sintomas que são normalmente provocados pelas outras fibras comuns fermentáveis (Nugent, 2005 como citado em Amaral, 2015).

6. Tipos de Amido Resistente

O AR subdivide-se em cinco categorias (AR1-AR5), de acordo com as diferentes características que lhe permitem a resistência à hidrólise (Champ *et al.*, 2003; Englyst, Kingman & Cumming, 1992; Englyst *et al.*, 1996; Higgins, 2013 como citado em Amaral, 2015).

O AR do tipo 1, representa o amido resistente à digestão porque não é fisicamente acessível na matriz do alimento. Encontra-se em estruturas vegetais parcialmente inteiras ou mal moídas como grãos e sementes. As leguminosas são também uma fonte de AR1 devido à espessura das suas paredes celulares (Champ, 2003; Englyst, 1996; Haralampu, 2000 como citado em Amaral, 2015; Murphy, Douglas & Birkett, 2008). A forma física do alimento impede o acesso da amilase pancreática e diminui a digestão do amido, condição que caracteriza o amido resistente tipo 1 (AR1 – fisicamente inacessível), ou seja, torna-se resistente simplesmente porque as enzimas amilolíticas não têm acesso ao mesmo. Esta resistência do amido à digestão pode ocorrer se o amido estiver contido numa estrutura inteira ou parcialmente destruída da planta, como nos grãos ou se as paredes celulares rígidas inibirem o intumescimento, como nas leguminosas (Nugent, 2005; Walter, Silva & Emanuelli, 2005). Processos que conduzam à rutura das paredes celulares, moagem ou mastigação, podem diminuir este tipo de amido (Champ *et al.*, 2003; Englyst *et al.*, 1996; Haralampu, 2000 como citado em Amaral, 2015).

O AR2 consiste nos grânulos de amido não gelatinizados que conservaram a estrutura cristalina, são exemplos o amido de batata crua e da banana verde. O processamento e a confeção dos alimentos reduzem o teor de AR2. A banana como normalmente é consumida crua, é a maior fonte de AR2 da dieta humana (Mendes, 2011). Contudo, durante o processo de amadurecimento, as enzimas intrínsecas do fruto convertem o amido em açúcares, diminuindo o teor de AR2 (Champ et al, 2003 como citado em Amaral, 2015).

O AR3 está presente na maioria dos alimentos amiláceos que sofreram um tratamento térmico (gelatinização) e de seguida foram arrefecidos e conservados desde algumas horas até vários meses. À medida que a temperatura do amido gelatinizado vai baixando as cadeias de amido tendem a interagir mais fortemente, estabelecendo entre si pontes de hidrogénio e formando duplas hélices. Estas estruturas cristalinas são altamente estáveis e constituem o amido retrogradado. É sobretudo a amilose que está envolvida no processo de retrogradação, embora a amilopectina também possa sofrer este fenómeno (Champ, 2003; Englyst *et al*, 1996; Haralampu, 2000; Sajilata, Singhal & Kulkarni, 2006 como citado em Amaral, 2015). Alimentos processados como batatas cozinhadas e arrefecidas, leguminosas enlatadas, pão e flocos de milho são exemplos de alimentos com teores de AR3 elevados. Devido à sua estabilidade o AR3 pode ser usado como ingrediente numa grande variedade de alimentos (Haralampu, 2000 como citado em Amaral, 2015).

Com o objetivo de acompanhar necessidades específicas da indústria alimentar, foram desenvolvidos produtos derivados do amido. Estes incluem amidos modificados quimicamente (ésteres, fosfatos e éteres), bem como amidos com ligações cruzadas. Tais amidos modificados caracterizam o amido resistente tipo 4 (AR4 – amido modificado) e devem a sua resistência à digestão por bloquearem o acesso das enzimas e formarem ligações atípicas (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Lobo e Silva, 2003; Nugent, 2005; Sajilata *et al*, 2006).

A União Europeia não aprova a utilização deste tipo de amido devido ao elevado número de modificações químicas introduzidas, no entanto é autorizado no Japão (Fuentes-Zaragoza *et al*, 2010; Lunn & Buttriss, 2007 como citado em Amaral, 2015).

A amilose pode ainda complexar com lípidos, formando estruturas rígidas, que restringem a expansão dos grânulos de amido durante o processo de cocção. O complexo amilose-lípido, resistente à hidrólise enzimática, caracteriza o amido

resistente tipo 5 (AR5 – complexo amilose-lípido). No geral, a estrutura e a quantidade do complexo amido-lípido dependem da fonte botânica e ocorre mais comumente em amidos com alto teor de amilose (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011). Este tipo de amido foi recentemente descrito e patenteado por Froberg e Quanz, requer altas temperaturas para gelatinizar e é mais suscetível de sofrer retrogradação (Homayouni *et al.*, 2014 como citado em Amaral, 2015).

A categorização do AR (tipos 1, 2, 3, 4 e 5) fornece a base conceitual para sua diferenciação. O AR1, AR2 e/ou AR3 podem coexistir no mesmo alimento. (Champ *et al.*, 2003 como citado em Amaral, 2015; Carcea *et al.*, 2009). O processamento dos alimentos crus, na maioria dos casos, degrada o AR1 e o AR2, mas pode produzir AR3 devido à retrogradação da amilose. O AR3 parece ser o tipo de AR com maior interesse devido à sua estabilidade térmica na maioria das operações de cozimento normais, ou seja, possibilita o seu uso como ingrediente em ampla variedade de alimentos convencionais, mantendo sua resistência à digestão (Pongjanta *et al.*, 2009 como citado em Polesi, 2009).

7. Fatores que influenciam o teor de AR nos alimentos

Durante o processamento e armazenamento, as mudanças ocorridas na estrutura do amido influenciam profundamente as suas propriedades funcionais e fisiológicas. A quantidade de água, o tempo e a temperatura de armazenamento são variáveis que influenciam no processo de cristalização e afetam diretamente o rendimento em AR (Lobo & Silva, 2003).

Os fatores que influenciam o teor de AR num alimento estão relacionados com a estrutura do grânulo, a relação amilose/amilopectina, a presença de açúcares, lipídios e proteínas e a existência de enzimas e outras substâncias inibidoras.

Skrabanja e Kreft, (ano) verificaram que repetidos ciclos de aquecimento e arrefecimento resultam no aumento do teor de amido retrogradado (AR3). O armazenamento em condições de temperatura reduzida (-20°C), também parece favorecer a formação de AR. O rendimento em AR é ainda influenciado pelo conteúdo em água e pela temperatura/tempo de processamento (Eerlinger & Delcour, 1995; Perera, Meda & Tyler, 2010 como citado em Amaral, 2015).

Em relação aos açúcares verificou-se que o rendimento em AR diminui quando é adicionada sacarose, glicose, maltose e ribose. Também a presença de

lípido diminui o teor de AR. A comunidade científica não é unânime nesta opinião, enquanto alguns autores acreditam que o complexo amilose –lípido compete com a cristalização da amilose, outros defendem que o próprio complexo amilose-lípido é uma forma de AR (Eelinger & Delcour1995; Sharma, Yadav & Ritika, 2008 como citado em Amaral, 2015).

A interação da proteína com o AR apresenta perspectivas diferentes relativamente aos vários tipos de amido. Alguns autores salientam o papel da matriz proteica na qual, parte do amido, se encontra encapsulado. Neste caso as proteínas influenciam o AR1, contribuindo para o seu aumento. Outro aspeto diferente é o das proteínas de adição em que parece haver uma diminuição do teor de AR3 com a presença de proteína (Eerlinger & Delcour,1995como citado em Amaral, 2015).

Além das fontes naturais de AR, o mercado de ingredientes para a indústria alimentar disponibiliza atualmente produtos comerciais que constituem importantes fontes de AR. Existem fórmulas comerciais de AR2 derivadas de amido de milho com elevado teor em amilose e de AR3 que, são obtidas a partir da gelatinização e recristalização do amido de milho ou tapioca (Fuentes-Zaragoza et al., 2010 como citado em Amaral, 2015).

8. Aplicações do Amido Resistente

O AR pode encontrar-se como componente natural do alimento ou como ingrediente que foi adicionado.

Há uma variedade de produtos alimentares que pode ser enriquecida com AR, nomeadamente produtos com humidade baixa, como por exemplo produtos de panificação, cereais pequeno-almoço, muffins e brownies. Estes produtos podem ser preparados com AR como fonte de fibra, aumentando assim o seu valor nutricional. Vários estudos têm mostrado que a utilização de AR confere aos produtos características organoléticas melhores do que fontes de fibras convencionais (Fontinha & Correia, 2010.). Em brownies, bolos e cookies, o AR proporciona ainda textura suave, que se mantém durante a vida útil do produto (Pereira, 2007; Sanz-Penella, 2011). Em biscoitos promove produtos mais crocantes e a sua capacidade de expansão pode propiciar melhores texturas em cereais pequeno-almoço. Também em cereais matinais, o AR proporciona aumento do tempo de permanência da sensação crocante. Devido ao baixo valor calórico, o AR pode ser usado em produtos com

apelos *diet* e *light*. Como fibra funcional, o AR possibilita formular produtos com maior apetência e mais saborosos quando comparados com os produtos formulados com as fibras convencionais (Nugent, 2005; Pereira 2007; Fontinha & Correia, 2010).

A adição de AR aos alimentos para os enriquecer nutricionalmente, pode ser realizada de forma isolada ou em associação com fibras convencionais. A grande vantagem da utilização do AR em vez das tradicionais fibras deve-se ao fato de que as fibras tradicionais são geralmente de coloração escura e têm sabor característico, nem sempre apreciado pelos consumidores. Quando utilizadas em alimentos processados de baixa humidade, como bolos, pães, massas, barras de cereais e biscoitos, absorvem muita água durante o processo de fabrico, modificando as características organoléticas do produto e também prejudicando a textura final que durante a vida de prateleira é intensificada (Pereira, 2007). Já o AR, quando utilizado em alimentos processados permite a incorporação de alta quantidade de fibra sem perder o sabor ou alterar a textura e a cor, tornando um alimento rico em fibra mais parecido com o tradicional. Esta condição pode contribuir significativamente para o aumento do consumo de fibra na dieta da população (Pereira, 2007; Maziarz, Sherrard, Juma, Prasad, Imrhan & Vijayagopal, 2012).

9. Benefícios fisiológicos do consumo de AR

O efeito fisiológico dos diferentes tipos de AR é muito similar ao das fibras. Apesar de quimicamente ser um amido, do ponto de vista nutricional tem mais semelhanças com os polissacarídeos não amiláceos do que com o amido digerível. O método de quantificação do AR é semelhante ao das fibras insolúveis, no entanto apresenta os benefícios fisiológicos das fibras solúveis e tal como estas tem um impacto positivo na saúde da flora microbiana intestinal (Harampulo, 2000 como citado em Amaral, 2015).

Por resistir à digestão e absorção no intestino delgado e ser um alimento fermentado no intestino grosso, principalmente pelas bifidobactérias, o AR funciona como prebiótico (Polesi, 2011). Durante a fermentação são produzidos ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), principalmente o butirato, que contribui significativamente para a saúde do cólon, pois inibe o crescimento de células anómalas e impede a instalação de microrganismos estranhos devido à redução do pH no intestino grosso (Murphy, Douglas & Birkett, 2008).

Uma característica importante do AR é a maior quantidade de butirato produzida quando comparado com outras fibras. Além disso, devido à sua fermentação lenta, não causa os desconfortos comuns das fibras alimentares (Polesi, 2011).

Pensa-se que os AGCC são os responsáveis pela maioria dos efeitos benéficos do AR. (Amaral, 2015; Murphy *et al.*, 2008).

Outros efeitos que parecem ser devidos aos AGCC, incluem a estimulação da contração muscular do cólon, aumentando o tônus muscular e a oxigenação, com benefícios para a absorção e transporte de nutrientes. Também se verifica o aumento do volume e consistência das fezes e a diminuição do tempo de trânsito intestinal, efeitos semelhantes aos demonstrados pela fibra alimentar (Amaral, 2015; Murphy *et al.*, 2008).

A passagem do AR no intestino delgado parece também limitar a quantidade de glicose que é absorvida e influenciar significativamente o metabolismo lipídico. Também há evidências que parecem indicar que uma dieta rica em AR aumenta a mobilização e utilização das reservas de gordura, podendo a longo prazo ajudar a diminuir a sua acumulação. Alguns estudos apontam para a possibilidade de alimentos ricos em AR induzirem maior saciedade (Amaral, 2015; Murphy *et al.*, 2008).

O interesse deste componente como prebiótico tem merecido igualmente especial atenção assim como a utilização do AR, em substituição do amido digerível, para reduzir o valor energético e aumentar o teor de fibra dos alimentos (Amaral, 2015).

O AR parece não ter impacto adverso sobre a função gastrointestinal em pessoas bem nutridas e pode até promover a saúde em crianças com gastroenterite. Além disso, parece ser aceite mais facilmente do que outras formas de fibras alimentares (farelo de trigo, por exemplo) em níveis elevados na dieta humana (Nugent, 2005 como citado em Amaral, 2015).

Consumos de 6 a 12 g de AR numa refeição revelaram efeitos benéficos sobre os níveis de glicose e insulina pós-prandial. No entanto 20 g/dia de AR tem sido considerado a dose diária necessária para promover benefícios nas doenças intestinais (Murphy, Douglas & Birkett, 2008; Basso, 2010; Salgado, de Faro, Guerra & Livera, 2005). Só para doses superiores a 30 g/dia de AR são descritos problemas de meteorismo, ligeiros efeitos laxantes e dores de estômago. (Nugent, 2005 como citado em Amaral, 2015; Murphy *et al.*, 2008).

10. Amido Resistente e índice glicémico

O índice glicémico (IG) classifica um alimento rico em hidratos de carbono (HC) com base no potencial aumento da glicemia após a sua ingestão, digestão e absorção, comparativamente com um alimento padrão (Alfenas & Paiva, 2007; Riccardi, Rivellese & Giacco, 2008; Siu & Wong, 2004 como citado em Curto & Sinde, 2012). O IG tem provado ser um conceito nutricional mais válido do que a simples classificação química dos HC, em simples ou complexos, pois permite uma nova visão entre a relação dos efeitos fisiológicos dos alimentos ricos em HC e a saúde (Curto & Sinde, 2012).

O IG foi referido inicialmente por Jenkins *et al.*, em 1981, e pretende classificar um alimento rico em HC com base no potencial aumento da glicemia após a sua ingestão, digestão e absorção, comparando com um alimento padrão (pão branco ou glicose). Atribui a cada alimento com HC um índice, comparando com o alimento padrão ao qual foi atribuído o valor 100. O índice é então calculado, para uma mesma quantidade de HC do alimento padrão (Kalergis, Grandpré & Andersons, 2005; Sunje, s.d.; Yang *et al.*, 2006 como citado em Curto & Sinde, 2012).

Para calcular o IG de uma refeição, calcula-se a percentagem de HC de cada alimento em relação aos HC totais da refeição, depois, multiplica-se este valor pelo IG de cada alimento e divide-se esse valor por 100. Somam-se então os valores obtidos para predizer o IG da refeição (Curto & Sinde, 2012).

Os alimentos com baixo grau de gelatinização do amido possuem menores valores de IG. (Soraya, Costa & Navarro, 2007 como citado em Curto & Sinde, 2012). Os alimentos podem ser armazenados sob diferentes temperaturas antes do seu consumo. Esta temperatura de armazenamento poderá condicionar alterações na estrutura do amido (pode, por exemplo, ocorrer conversão de amido em AR) e, por conseguinte, provocar alterações no valor do IG do alimento (Brand-Miller *et al.*, 2002 como citado em Curto & Sinde, 2012).

O tipo de amido (amilose/amilopectina) afeta as respostas glicémicas, por exemplo o arroz, rico em amilopectina, tem uma taxa de absorção elevada porque as enzimas digestivas podem facilmente atingir a estrutura do amido e consequentemente, eleva-se a concentração de glicose no sangue e o oposto acontece

com a amilose. Legumes e massa são exemplos de alimentos com elevada razão amilose/ amilopectina, tendendo por isso a ter menores valores de IG (Carreira, Lajolo & Wenzel de Menezes, 2004; Moraes Silva & Ferreira de Mello, 2006 como citado em curto & Sinde, 2012).

Concluindo, uma razão elevada amilose/amilopectina reduz o IG dos alimentos. O revestimento fibroso dos feijões ou ainda das sementes por exemplo agem como uma barreira física e retarda o acesso das enzimas ao amido interior, logo reduz o IG (Curto & Sinde, 2012).

Apesar de ter apresentado alguma controvérsia, o IG tem provado ser um conceito nutricional mais válido do que a simples classificação química dos HC em simples ou complexos, pois permite uma nova visão entre a relação dos efeitos fisiológicos dos alimentos ricos em HC e a saúde (Curto & Sinde, 2012).

II. Trabalho Experimental

1.Descrição do trabalho

Os ensaios experimentais decorreram em Outubro e Novembro de 2014 e foram avaliadas 6 amostras de diferentes variedades de pão à venda no comércio local. Pretendeu-se testar variedades de pão o mais distintas entre si, nomeadamente pão de trigo, pão de mistura (trigo+centeio), pão integral, broa de milho, pão com sementes e pão com aveia e cevada. Cada uma das variedades foi avaliada no próprio dia da confeção e após conservação em vácuo durante 7 dias à temperatura ambiente. Os ensaios foram repetidos três vezes. A tabela nº 2 apresenta o plano de ensaios.

Tabela nº 2 – Cronograma de ensaios.

Data (2014)	1º ensaio S/ conservação	2º ensaio S/ conservação	3º ensaio S/ conservação	1º ensaio C/ conservação	2º ensaio C/ conservação	3º ensaio C/ conservação
15/16 de Outubro	X					
22/23 de Outubro				X		
27/28 de Outubro		X				
29/30 de Outubro			X			
03/04 de Novembro					X	
05/06 de Novembro						X

Cada amostra foi avaliada relativamente ao teor de humidade e de AR.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

Para a realização deste trabalho prático foram utilizados seis tipos diferentes de pão, a tabela nº 3 apresentada abaixo contém toda a informação relevante sobre as amostras. Na amostra A houve uma situação diferente do que se passou com as restantes, na 2ª compra não estava à venda o mesmo pão, por isso foi necessário optar por outro o mais semelhante possível e foi com esse que se efetuaram os dois ensaios restantes (Amostra A1).

Tabela nº 3 – Informação relevante sobre as amostras.

Identificação da Amostra	Tipo de Pão	Ingredientes	Local de Compra
A	Pão de trigo 50g	Farinha de trigo T65, água, levedura, sal, antiaglomerante (E170), emulsionante (E472e), agente de tratamento da farinha, ácido ascórbico e enzimas	Hipermercado Continente
A1	Pão de trigo 58g	Farinha de Trigo, água, levedura, melhorante (Glúten, farinha de trigo, antiaglomerante (E170), emulsionantes (E472e, E471, E322 (Soja), E481), gordura vegetal (palma), dextrose, farinha de Malte de Cevada, agente tratamento farinha (E300), enzimas, soro Leite, amido de Trigo, regulador acidez ((E262i)), sal, óleo (girassol). Pode conter vestígios de ovo, amendoim, frutos de casca rija, sementes de sésamo e sulfitos.	Hipermercado Continente
B	Pão de mistura 80g (trigo + centeio)	Farinha de trigo T65, farinha de trigo T150, farinha de centeio T130, água, massa mãe, levedura, melhorante e sal	Hipermercado Continente

C	Pão integral 80g	Farinha de trigo e farinha de trigo integral, água, sêmea de trigo, levedura, sal, melhorante (antiaglomerante (E170), farinha de Soja, emulsionantes (E472e, E471), reguladores de acidez (E341, E340, E33)) agente de tratamento da farinha (E300), dextrose, enzimas, farinha de trigo). Pode conter vestígios de ovo, amendoim, leite, frutos de casca rija, sementes de sésamo e sulfitos	Hipermercado Continente
D	Broa de milho 550g	Farinha de milho T175, farinha de trigo T65, farinha de centeio T130, levedura, água, sal, açúcar. Pode conter vestígios de ovo ou produtos à base de ovo, soja ou produtos à base de soja, leite ou produtos à base de leite (incluindo lactose), frutos de casca rija, dióxido de enxofre ou sulfitos, sementes de sésamo ou produtos à base de sementes de sésamo.	Supermercado LIDL
E	Pão com sementes 70g	Farinha de trigo T65, Credin 3 cereais (produto semi completo para o fabrico de pão de cereais, contém flocos de centeio, farelo de trigo e sementes de linho), água, levedura, mistura de 4 sementes, (sementes de sésamo, aveia, girassol e linhaça).	Hipermercado Continente
F	Pão com aveia e cevada (PROKORN) 400g	Pão especial Prokorn, alto teor em cálcio, fonte de magnésio, alto teor de fibra. Composto Prokorn (59%), farinha de trigo, farinha de trigo integral, sementes de girassol, glúten, linhaça, milho extrudido, flocos de soja, sementes de soja, fibra de trigo, milho painço, sal, (cloreto de sódio e cloreto de potássio), cálcio (Carbonato de cálcio), farinha de centeio, farinha de malte (centeio e cevada), açúcar, fibra (inulina), sêmola de milho, massa fermentada (contém glúten), emulsionantes (E471 e E322), conservante (E282), magnésio (sulfato de magnésio), cevada, agentes de tratamento da	Hipermercado Continente

		farinha (E300), enzimas (contém glúten), água, sementes decorativas de trigo sarraceno, levedura, farinha de trigo T65 corrigida (farinha de trigo T65, agente de tratamento da farinha (E300)), enzimas (contém glúten) e glúten de trigo.	
--	--	---	--

2.2. Determinações analíticas

2.2.1. Determinação da Humidade

Para a determinação do teor de humidade na amostra foi utilizado o método constante na Norma NP 2966 de 1986 – Derivados de cereais. Pão. Determinação do teor de água.

Definição do Método

Entende-se por teor de água do pão a quantidade de água, expressa em percentagem, avaliada pela perda de massa sofrida pelo produto inicial nas condições a seguir descritas.

Resumo do Processo

Secagem do produto a uma temperatura compreendida entre 100-105°C, após fragmentação, condicionamento prévio e avaliação da perda de massa.

Aparelhos e utensílios

- Balança sensível ao decigrama
- Balança sensível ao decimilograma
- Triturador construído em material não higroscópico, fácil de limpar e apresentando um espaço morto mínimo
- Cápsulas de porcelana ou metálicas com uma superfície útil que permita a distribuição em camada única da toma para análise

- Estufa isotérmica de aquecimento elétrico regulável entre 60° e 105° e que possua uma ventilação suficiente
- Exsicador que contenha uma substância desidratante eficaz (ex. sílica granulada com indicador)
- Placa de madeira ou de material adequado para cortar o pão
- Faca

Técnica

Preparação da Amostra

Para pão com peso inferior a 150g, retiram-se ao acaso 3 unidades que se cortam em cubos com cerca de 1 cm de aresta. Se o número de unidades for inferior a 3, corta-se a totalidade da amostra como atrás descrito. Distribui-se a amostra pelas cápsulas previamente taradas e pesa-se com a aproximação de 0,1g.

Para pão com peso superior a 150g, toma-se $\frac{1}{4}$ da amostra obtida por corte em cruz, segundo a maior e a menor das suas dimensões, seguindo-se as operações indicadas anteriormente.

Pré-secagem

Introduz-se a(s) cápsula (s) que contém o produto em análise na estufa regulada a 60-65° C, aí permanecendo 16h. Ao fim deste tempo, retira-se a (s) cápsula (s) e deixa-se arrefecer ao ar pelo menos durante 2h. Depois de arrefecida, pesa-se com a aproximação de 0,1g.

Trituração

Tritura-se o produto obtido anteriormente de modo a passar através de um peneiro de 2 mm e homogeneíza-se.

Toma para Análise

Pesa-se, com a aproximação de 0,001g, em cápsulas previamente secas e taradas, 5g do produto obtido na etapa anterior.

Secagem

Introduz-se a cápsula que contém a toma para análise na estufa regulada a 100-105° C e, ao fim de 2 horas (tempo contado a partir do momento em que a estufa atingiu novamente tal temperatura), retira-se e coloca-se no exsiccador.

Pesa-se a cápsula depois de arrefecida à temperatura ambiente, repetindo-se a operação de hora a hora, até se obter massa constante. O ensaio é feito em duplicado.

Resultados

Cálculos:

Sendo:

m_0 = a massa, expressa em gramas, da toma para análise;

m_1 = a massa, expressa em gramas, da toma para análise após secagem;

m_2 = a massa, expressa em gramas, da amostra retirada antes do condicionamento prévio;

m_3 = a massa, expressa em gramas, da amostra pré-condicionada;

O teor de água, expresso em percentagem da massa do produto tal qual é dado pela seguinte fórmula:

$$100 \left(1 - \frac{m_1 \times m_3}{m_0 \times m_2} \right)$$

Toma-se como resultado a média aritmética dos valores obtidos.

2.2.2. Determinação do Amido Resistente

Para a determinação do Amido Resistente foram seguidos os Métodos AOAC 2002.02 e AACC 32-40.01 com o Kit Megazyme K-RSTAR 09/14.

Aplicabilidade e Precisão do método

O método quantifica o amido resistente em amostras que contêm mais de 2% w/w de amido resistente.

Resumo do Processo

As amostras são incubadas com α -amilase pancreática e amiloglucosidade (AMG), num banho-maria com agitação a 37° C durante 16 horas. Durante este tempo o amido não resistente é solubilizado e hidrolisado a D-glucose através da ação combinada das duas enzimas. A reação termina com a adição de um volume igual de etanol ou álcool desnaturado industrial e o amido resistente é recuperado na fração sólida por centrifugação. Esta é então lavada duas vezes por suspensão em etanol desnaturado ou etanol (50% v/v), seguido de centrifugação. O sobrenadante é retirado por decantação.

O resíduo sólido de amido resistente é dissolvido em KOH 2M num banho de água com gelo e agitação vigorosa. Esta solução é neutralizada com solução tampão de acetato de sódio e o amido é quantitativamente hidrolisado a glucose pela AMG.

A D-glucose é doseada com o reagente de glicose oxidase / peroxidase (GOPOD) e esta é a medida do teor de amido resistente da amostra (Megazyme, 2014).

kit Megazyme

O kit da Megazyme é adequado para a realização de 100 determinações de amido resistente, contém:

Frasco nº 1 - Amiloglucosidase [12 ml, 3300 U / ml de amido solúvel (ou 200 U / ml de p- nitrofenilo β -maltósido)] a pH 4,5 e 40°C.

Frasco nº 2 - α -amilase pancreática (pancreatina, 10 g).

Frasco nº 3 – Reagente tampão GOPOD (48 ml, pH 7,4)

Frasco nº 4 - Reagente GOPOD enzimas.

Frasco nº 5 – Solução padrão D-Glucose (5 ml, 1,0 mg / ml).

Frasco nº 6 - Padrão de amido resistente.

Preparação das Soluções

Solução AMG diluída (300 U/ml):

Diluir 2 ml da solução tampão AMG (frasco nº 1) em 22 ml de solução tampão de maleato de sódio (0,1M, pH 6,6). Dividir em alíquotas de 5 ml e congelar em recipientes de polipropileno.

Solução de α -amilase e AMG

Imediatamente antes do seu uso, colocar 0,6 mg de α -amylase num gobelé numa placa com agitador magnético, juntar 60 ml de solução tampão de maleato de sódio e por fim adicionar 0,6 ml de AMG diluído. Dividir por 8 tubos e centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm.

Reagente de glucose oxidase/peroxidase:

Diluir o conteúdo do frasco 3 (reagente tampão GOPOD) em 1 l de água destilada. Dissolver o conteúdo do frasco 4 em 20 ml da solução anterior e transferir este na totalidade para o recipiente que contém o restante da solução 3. Envolver este recipiente com folha de alumínio para proteger o recipiente da luz.

Solução tampão de maleato de sódio (100 Mm, pH 6,0):

Dissolver 23,2 g de ácido málico em 1600 ml de água destilada e ajustar o pH a 6 com hidróxido de sódio 4M. Adicionar 0,74 g de cloreto de cálcio dihidratado e 0,4 g de azida de sódio e dissolver. Ajuste o volume para 2 l.

Solução tampão de acetato de sódio (1,2M, pH 3,8):

Adicionar 69,6 ml de ácido acético glacial (1,05 g/ml) a 800 ml de água destilada e ajuste o pH a 3,8 usando hidróxido de sódio 4 M. Ajustar o volume para 1 l com água destilada.

Solução tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 4,5):

Adicionar 5,8 ml de ácido acético glacial a 900 ml de água destilada e ajustar o pH a 4,5 com hidróxido de sódio 4 M. Ajustar o volume a 1 l com água destilada.

Solução de hidróxido de potássio 2M:

Adicione 112,2 g de KOH a 900 ml de água desionizada e dissolver por agitação. Ajustar o volume a 1 l.

Etanol 50% v/v:

Adicionar 500 ml de etanol (95% v/v ou 99% v/v) a 500 ml de H₂O. Guardar num frasco bem fechado.

Equipamentos e utensílios

- Centrifugadora
- Picadora elétrica
- Banho-maria com agitação, em movimento linear a 100 rotações/minuto, com um comprimento de curso de 35 mm e 37°C
- Banho de água (50°C +/- 0,1°C)
- Vórtex
- Placa magnética
- Agitadores magnéticos
- Medidor de pH
- Relógio digital
- Balança analítica
- Espectrofotômetro
- Pipeta automática 100 µl, com pontas descartáveis
- Pipeta manual 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml
- Tubos de ensaio de vidro de 14 ml de capacidade
- Recipiente de plástico suficiente para o suporte dos tubos de ensaio como banho de água com gelo
- Termómetro 37°C +/- 0,1°C e 50°C +/- 0,1°C
- Frascos volumétricos de 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1 l e 2l de capacidade
- Faca
- Tábua

- Cadinhos
- Recipientes em plástico para as amostras

Procedimento

A partir de uma toma de amostra de cerca de 50 g bem triturada e homogeneizada pesar, para cada um de dois tubos, cerca de 250 mg de pão e registar o valor.

Pesar também 100 mg de padrão de amido resistente em duplicado.

Adicionar a cada tubo 4,0 ml de solução de α -amylase pancreática e AMG. Tapar os tubos e agitar no vórtex

Colocá-los horizontalmente no banho a 37° C com agitação contínua por 16 horas a 200 movimentos/minuto.

Retirar os tubos do banho de água, limpar o excesso de água da superfície com papel e retirar as tampas.

Colocar 4ml de etanol (99% ou IMS 99% v/v) com agitação no vórtex.

Colocar os tubos a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm

Retirar com cuidado o sobrenadante e de uma só vez.

Colocar 2 ml de 50% de IMS com agitação em cada tubo.

Adicionar mais 6 ml de 50% de IMS e agitar de novo.

Centrifugar novamente mais 10 minutos a 3000 rpm.

Retirar novamente o sobrenadante e de novo adicionar 2 ml de 50% e de seguida 6 ml sempre com agitação.

Centrifugar mais uma vez.

Retirar e extrair de novo o sobrenadante, inclinar os tubos de forma a sair o máximo possível e limpar o bordo dos tubos.

Colocar os tubos num banho de gelo e água com agitação e um agitador magnético em cada tubo. Com a agitação já ligada adicionar 2 ml de KOH 2M.

Deixar os tubos no banho de gelo e água com agitação durante 20 minutos

Adicionar 8 ml de solução tampão de acetato de sódio 1,2 M (pH 3,8) a cada tubo, com agitação.

Adicionar imediatamente 0,1 ml de AMG (Solução 1, 3300 U/m).

Misturar bem e de seguida colocar os tubos em banho-maria a 50°C, durante 30 minutos, agitando no vórtex aproximadamente de 5 em 5 minutos

Para amostras que contêm menos de 10 % de amido resistente (que será o caso das amostras)

Centrifugar os tubos durante 10 minutos a 3000 rpm .

Transferir 0,1 ml (pipeta automática) em duplicado dos sobrenadantes para tubos de ensaio de vidro

Adicionar 3,0 ml de reagente de GOPOD e colocar de novo no banho a 50°C durante 20 minutos

No final deste tempo medir a absorvância de cada solução, a 510 nm, contra o ensaio em branco.

Para amostras que contêm mais de 10% de amido resistente (que será o caso do Padrão)

Transferir na totalidade o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 100 ml, efetuando várias lavagens do tubo com água destilada.

Ajustar o volume a 100 ml com água destilada e agitar bem. Retirar uma alíquota de cerca de 10 ml para tubo de ensaio e centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm

Adicionar 3,0 ml de reagente de GOPOD e colocar de novo no banho a 50°C durante 20 minutos

No final deste tempo medir a absorvância de cada solução, a 510 nm, contra o ensaio em branco.

Preparação do reagente branco:

0,1 ml de tampão de 100 mM de acetato de sódio (pH 4,5)

+

3,0 ml de reagente GOPOD

Preparação do padrão D-glucose (em quadruplicado):

0,1 ml de D-glucose (1 mg/ml)

+

3,0 ml de reagente de GOPOD

2.2.3. Cálculos

Amido Resistente (g/100 g Amostra) (Amostras que contêm > 10% AR):

$$= \Delta E \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$$

$$= \Delta E \times F/W \times 90.$$

Amido Resistente (g/100 g Amostra) (Amostras que contêm < 10% AR):

$$= \Delta E \times F \times 10.3/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$$

$$= \Delta E \times F/W \times 9.27.$$

Em que:

AE = absorção (reação) lida contra o branco de reagente.

F = 100 (µg de D-glucose)/Absorvância para 100 µg de D-glucose

100 / 0,1 = correção do volume (0,1 ml retirados de 100 mL).

1/1000 = conversão de microgramas a miligramas

W = peso seco da amostra analisada

= Amido resistente (g /100 g) x ((100- teor de humidade)/100)

100/W= fator que apresenta o amido resistente como percentagem do peso da amostra

162/180= Fator para converter a D-glucose livre, como determinado, em anidro- D-glucose como ocorre no amido

10.3/0.1= Correção do volume (0,1 ml extraídos de 10,3 ml) para amostras contendo 0-10% de AR onde a solução de incubação não está diluída e o volume final é aproximadamente 10,3 ml.

Nota: A Megazyme tem disponível no seu site www.megazyme.com uma folha de cálculo para determinação do teor de AR por 100 g de alimento e por 100 g de peso seco.

2.3. Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado utilizando o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 23.0. Para analisar os efeitos da fórmula, do tamanho do pão e das condições de cozimento os dados foram estudados utilizando a análise de variância ANOVA a um fator (ANOVA one-way) e a comparação entre pares de médias foi efetuada pelo teste de Duncan. Consideraram-

se estatisticamente significativos os efeitos cujo *p-value* foi inferior ou igual a 0,05. Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

As diferentes variedades de pão em estudo foram analisadas em dois momentos aos 0 dias e ao fim de 7 dias de conservação, em vácuo, à temperatura ambiente.

A humidade, a concentração de AR por 100g de pão e a concentração de AR por 100g de peso seco, dos três ensaios efetuados a cada uma das diferentes amostras aos 0 dias de conservação estão representados na Tabela nº 4.

Tabela nº 4 – Teor de humidade e de AR das diferentes amostras analisadas aos 0 dias de conservação

Amostras		Humidade (%)	AR (g/100g pão)	AR (g/100g peso seco)
A	1ºensaio	29,7	0,55	0,78
	2º ensaio	27,0	1,43	1,96
	3º ensaio	29,9	1,13	1,62
	Média \pm DP	28,9 \pm 1,6	1,04 \pm 0,45	1,45 \pm 0,61
B	1ºensaio	34,5	0,68	1,04
	2º ensaio	29,6	0,63	0,89
	3º ensaio	30,3	0,62	0,89
	Média \pm DP	31,5 \pm 2,7	0,64 \pm 0,03	0,94 \pm 0,09
C	1ºensaio	33,4	0,62	0,94
	2º ensaio	31,3	0,58	0,85
	3º ensaio	31,9	0,66	0,96
	Média \pm DP	32,2 \pm 1,1	0,62 \pm 0,04	0,92 \pm 0,06
D	1ºensaio	31,5	1,51	2,21
	2º ensaio	32,1	1,45	2,13
	3º ensaio	30,7	1,54	2,22
	Média \pm DP	31,4 \pm 0,70	1,50 \pm 0,05	2,19 \pm 0,05
E	1ºensaio	27,2	0,87	1,19

	2º ensaio	25,0	0,82	1,10
	3º ensaio	26,9	0,80	1,09
	Média±DP	26,4±1,2	0,83±0,03	1,13±0,06
F	1º ensaio	37,6	0,87	1,39
	2º ensaio	35,6	0,76	1,18
	3º ensaio	34,3	0,81	1,23
	Média	35,8±1,7	0,81±0,06	1,27±0,11

A – Pão de trigo; B – Pão de mistura (trigo + centeio); C – Pão integral; D – Broa de milho; E – Pão com sementes; F – Pão com aveia e cevada

A tabela nº 5 representa a comparação das médias das concentrações de AR com os respectivos desvios-padrão através do teste de Duncan aos 0 dias. As letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Tabela nº 5 – Teor médio de AR (g/100 de peso seco) das amostras aos 0 dias.

Amostras	0 dias
A	1,45 ^b ±0,61
B	0,94 ^a ±0,09
C	0,92 ^a ±0,06
D	2,19 ^c ±0,05
E	1,13 ^{ab} ±0,06
F	1,27 ^{ab} ±0,11

Após a análise dos resultados dos 3 ensaios sem conservação e comparando com valores publicados em estudos anteriores podemos dizer que no pão de trigo o valor obtido situa-se dentro do intervalo de valores mínimo e máximo (0,1 – 4,4 g/100g pão) e é também muito próximo do valor de referência (1,2 g/100g pão), tendo sido encontrado um mínimo de 0,1 e um máximo de 4,4 (Murphy *et al*, 2008).

O valor de referência para pão de centeio publicado é de 3,2 g/100g pão e não são referidos valor mínimo nem máximo (Murphy *et al*, 2008). Este valor fica muito acima do valor obtido na amostra B, no entanto esta amostra tem mistura de centeio e trigo enquanto na bibliografia é só pão de centeio.

Segundo Murphy *et al*, 2008, os valores de referência para o pão integral são 1,0 g/100g pão, tendo sido encontrado um mínimo de 0,5 e um máximo de 1,5 g/ 100g pão. Esta amostra fica entre o intervalo de valores mínimo e máximo de referência.

Para as restantes amostras não foram encontrados valores de referência para comparação.

Podemos observar que o pão com maior concentração de AR no ensaio sem conservação é a broa de milho, seguindo-se o pão de trigo, de seguida temos o pão com sementes e o pão com aveia e cevada e por fim o pão de mistura e o integral que são os que apresentam menor concentração de AR.

Após análise de variância podemos afirmar que há diferenças significativas entre as amostras com $P < 0,05$.

As amostras B e C são semelhantes entre si e não diferem de E e F, a amostra A é diferente da B e C, mas não é diferente da E e F. A amostra D é diferente de todas as outras amostras. Desta análise podemos concluir que a broa de milho tem um maior teor de AR relativamente a todas as outras amostras.

A elevada concentração de AR na broa de milho pode explicar-se pelo elevado teor de amilose que a farinha de milho contém, sendo por isso mais suscetível de sofrer retrogradação promovendo a formação de AR.

As amostras B e C são as que contêm menor teor de AR, esta situação poderá dever-se ao facto de serem as que têm mais fibra. Embora, a fibra também apresente benefícios para a saúde, a existência de mais fibra origina uma menor quantidade de amido e consequentemente menos retrogradação e menos formação de AR.

A amostra A tem mais amido do que a B e C pois é constituída por farinha de trigo que contém teores de amido mais elevados, logo também mais AR. No entanto esta amostra A, a que foi comprada posteriormente apresenta valores de AR anormalmente elevados, pode justificar-se com o facto de além de conter farinha de trigo também conter farinha de Malte de cevada, que também é muito rica em AR.

As amostras E e F contêm valores de AR superiores às B e C, facto que se pode explicar com a presença das sementes que fazem parte da constituição destes dois pães. Estas contêm amido resistente do Tipo 1, ou seja amido que é fisicamente inacessível, no entanto com processos que conduzam à rutura das paredes celulares como a trituração que realizámos à amostra podem diminuir este tipo de AR.

Na amostra F pode referir-se também o elevado teor de amido resistente existente na cevada, que é um dos compostos deste pão, para além de muitos outros ricos em AR, como milho, farinha de trigo, farinha de malte (cevada e centeio) e farinha de trigo integral, entre outros.

Na tabela nº 6 estão representadas a humidade, a concentração de AR por 100g de pão e a concentração de AR por 100g de peso seco, dos três ensaios efetuados a cada uma das diferentes amostras aos 7 dias de conservação.

Tabela nº 6- Teor de humidade e de AR das diferentes amostras analisadas aos 7 dias de conservação

Amostras		Humidade (%)	AR (g/100g pão)	AR (g/100g peso seco)
A	1ºensaio	27,4	0,61	0,84
	2º ensaio	27,2	1,16	1,59
	3º ensaio	30,2	1,36	1,95
	Média±DP	28,3±1,7	1,04±0,39	1,46±0,57
B	1ºensaio	30,3	0,69	0,99
	2º ensaio	29,9	0,68	0,96
	3º ensaio	33,2	0,78	1,16
	Média±DP	31,1±1,8	0,71±0,05	1,04±0,11
C	1ºensaio	33,9	0,59	0,89
	2º ensaio	30,6	0,57	0,82
	3º ensaio	31,1	0,68	0,99
	Média±DP	31,9±0,69	0,61±0,06	0,90±0,09
D	1ºensaio	32,1	1,56	2,29
	2º ensaio	32,1	1,38	2,04
	3º ensaio	33,3	2,00	2,99
	Média±DP	32,5±0,69	1,65±0,32	2,44±0,50
E	1ºensaio	27,4	0,69	0,96
	2º ensaio	25,2	0,81	1,08
	3º ensaio	26,4	1,08	1,46
	Média±DP	26,3±1,1	0,86±0,20	1,17±0,26
F	1ºensaio	36,6	0,82	1,29
	2º ensaio	35,8	0,93	1,45
	3º ensaio	34,8	1,01	1,55
	Média±DP	35,7±0,9	0,92±0,10	1,43±0,13

A tabela nº 7 representa a comparação das médias das concentrações de AR com os respetivos desvios-padrão através do teste de Duncan aos 7 dias. As letras diferentes representam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Tabela nº 7 – Comparação das médias da concentração de AR (g/100 de peso seco) das amostras aos 7 dias pelo Teste de Duncan.

Amostras	7 dias
A	1,46 ^a ±0,57
B	1,04 ^a ±0,11
C	0,90 ^a ±0,09
D	2,44 ^b ±0,50
E	1,17 ^a ±0,26
F	1,43 ^a ±0,13

Não foram encontrados valores de referência para pão conservado durante 7 dias à temperatura ambiente embalado em vácuo.

Após análise dos resultados podemos deduzir que o pão que apresenta maior concentração de AR nos ensaios com conservação é a broa de milho, seguindo-se o pão de trigo, de seguida temos a o pão com sementes e o pão com aveia e cevada e por fim o pão de mistura e o integral que ocupam os últimos lugares.

Após análise de variância dos dados podemos dizer que há diferenças significativas entre as amostras com $P < 0,05$.

Só a amostra D é significativamente diferente de todas as outras amostras.

No geral há um ligeiro aumento nas concentrações de AR que se deve à retrogradação da amilopectina ao longo do tempo no entanto não é significativo.

Só a amostra D revela valores mais elevados de AR e tal como já foi mencionado deve-se ao elevado teor de amilose existente na farinha de milho.

O efeito da conservação durante 7 dias, em vácuo, à temperatura ambiente no teor de humidade e no teor de AR está representado nas figuras nº 1 e 2.



Figura nº 1 – Percentagem média de humidade nas diferentes amostras aos 0 dias e aos 7 dias de conservação em vácuo, à temperatura ambiente.

Pela análise da Figura nº 1 verificou-se que entre os 0 e 7 dias não há diferenças relevantes no teor de humidade entre as diferentes amostras. A percentagem de humidade nas várias amostras oscila entre 26 e 36, não sendo muito diferentes entre si. O embalamento a vácuo protegeu o pão da perda de humidade, esperava-se que o teor de humidade do pão diminuísse e não foi o que aconteceu, pelo contrário manteve-se e na amostra D ainda aumentou um pouco.

Ao fim dos 7 dias de conservação mesmo embalado em vácuo o pão apresentava bolores evidentes não estando em condições de ser consumido.

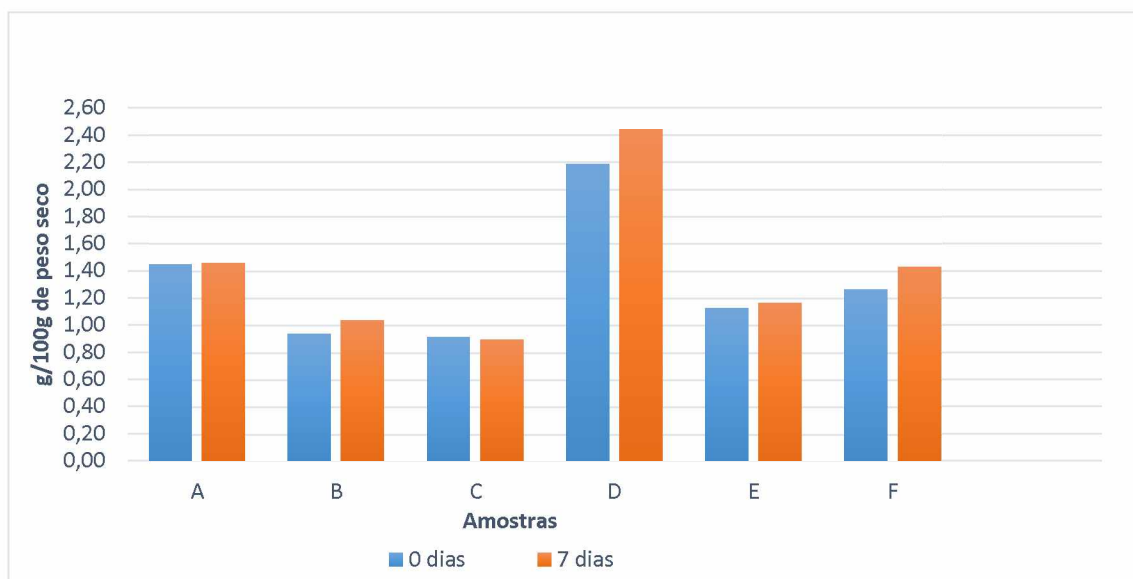


Figura nº 2 – Teor médio de AR (peso seco) nas diferentes amostras aos 0 dias e aos 7 dias de conservação em vácuo, à temperatura ambiente.

A comparação das diferenças das médias foi efetuada recorrendo ao teste t-student e revelou que as amostras não apresentam diferenças significativas entre os 0 e os 7 dias com $p > 0,05$.

No entanto através da análise do gráfico verifica-se que houve um ligeiro aumento em quase todas as amostras, sendo maior na amostra D, que se deve como referido anteriormente à retrogradação da amilopectina ao longo do tempo. No entanto estes pequenos aumentos não são significativos.

3.1. Consumos diários de Amido Resistente

Calculou-se os consumos diários de AR derivado apenas do pão, de alguns tipos de pão com dados consultados no EpiPorto, 2006.

Segundo o documento anteriormente mencionado, a quantidade de pão consumida por mulheres por dia é 113,6 g e por homens 136 g.

Efetuuou-se a média dos dois em que resultou um valor de 125 g de pão/dia. Com as médias de AR obtidas anteriormente, em g/100g peso seco aos 0 dias calculou-se:

Para Pão de Trigo:

$$\begin{array}{l} 1,4\text{g}-----100\text{g} \\ X-----125\text{g} \end{array}$$

em que:

$$X = \frac{1,4 * 125}{100} = 1,81\text{g/dia}$$

Calculou-se de igual forma para todos os tipos de pão estudados e na tabela abaixo, estão calculados valores de consumos diários de AR para cada tipo.

Tabela nº 8 – Consumos diários de AR dos vários tipos de pão que constituem a amostra analisada.

Tipos de Pão	Amido Resistente (g/dia)
Pão de Trigo	1,81
Pão de mistura (trigo + centeio)	1,18
Pão integral	1,15
Broa de milho	2,74
Pão com sementes	1,41
Pão com aveia e cevada	1,59

De acordo com a tabela nº 8 o pão que permite ter um consumo de amido resistente superior é a broa de milho, os restantes são todos muito semelhantes.

É uma escolha pessoal de cada individuo o tipo de pão que consome, mas estes dados permitem escolher em consciência.

No entanto estes valores são apenas correspondentes ao pão e não a todos os outros alimentos que consumimos por dia.

4. Conclusões

Com este trabalho conclui-se que das 6 variedades de pão que fizeram parte do estudo o que contém maior teor de Amido Resistente é a broa de milho com valores significativamente superiores às restantes amostras. Após os 7 dias de conservação à temperatura ambiente e embaladas em vácuo, as amostras não mostraram diferenças significativas do teor de AR, embora tenham ocorrido ligeiros aumentos.

A humidade também praticamente não variou ao longo do tempo, devido certamente ao embalamento em vácuo. Os pães no 7º dia já revelavam bolores, não estando próprios para consumo.

Estimou-se o consumo diário de AR relativamente ao pão consumido pela população Portuguesa e verificou-se que a escolha que possibilita uma maior ingestão de AR é a broa de milho.

III. Perspetivas Futuras

Não é possível fazer uma estimativa de AR total da nossa dieta porque não estão publicados teores deste composto noutros alimentos que fazem parte da dieta geral dos portugueses. No entanto, devido aos benefícios associados a esta fração do amido, seria muito interessante que fosse estudado o teor de AR em vários alimentos para que fosse possível fazer uma estimativa do total de AR que consumimos por dia.

Seria também bastante interessante explorar a área dos alimentos enriquecidos com AR, já existem alguns produtos, mas em Portugal são inexistentes.

Com o conhecimento do teor total de AR que consumimos por dia seria possível fazer recomendações de ingestão de alimentos enriquecidos com AR ou simplesmente escolhermos alimentos naturalmente ricos em AR, de forma a aproximarmos a nossa ingestão total diária de AR dos 20 g/dia que são aconselhados.

Também se deve realçar a necessidade de investigação de técnicas de processamento, temperaturas e tempos de conservação que aumentem naturalmente a quantidade de AR nos alimentos.

Referências Bibliográficas

- Amaral, O. (2015). Amido Resistente: Propriedades fisiológicas e aplicações. TecnoAlimentar – Aditivos e Nutrientes, nº 4, p. 75-79
- Barczak, B., Sikora, E., Sikora, M., & Kapusta-Duch, J. (2014). The influence of prolonged frozen storage of wheat-flour rolls on resistant starch development. Starch/Stärke, 66, p.533-538
- Basso, C. (2010). Amido resistente: Efeito de processamento, aceitabilidade e resposta glicêmica. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
- Carcea, M., Salvatorelli, S., & Tufani, V. (2009). Measurement of resistant starch in cooked cereal – based foods. National Institute for Research on Food and Nutrition (INRAN), Roma, Italy, p.240-245
- Carvalho, M. L. S., & Santos, M. O. G. (2008). Economia, sociologia e desenvolvimento rural. Actas do 1º Encontro Luso-Angolano, Universidade de Évora, Évora, 16-18 Outubro 2008
- Comission del Codex Alimentarius, (2009). Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de La salud. Roma (Italia), 29 de Junio – 4 de Julio de 2009
- Cummings, J. H., Roberfroid, M. B. and members of the Paris Carbohydrate Group, Andersson, H., Barth, C., Ferro-Luzzi, A., Ghos, Y., Gibney, M., Hermansen, K., James, W. P. T., Korver, O., Lairan, D., Pascal, G., & Vorage, A.O.S. (1997). A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. European Journal of Clinical Nutrition, 51, p.417-423

- Curto, C.; Sinde, S. (2012). Utilização do índice glicémico para melhor controlo da glicemia e peso corporal. Cientificidades, Artigos de revisão. Revista Nutricias,12: 40-43
- Dall`Alba, V. (2010). Papel das fibras alimentares no diabetes melito 2: Aspectos gerais relacionados ao manejo dietoterápico e efeito da suplementação com fibra solúvel sobre os componentes da síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Medicina – Universidade do Rio Grande do Sul, Brasil
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. N. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to resistant starch and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 681), “digestive health benefits” (ID 682) and “favours a normal colon metabolism” (ID 783) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4). Retrieved from 10.2903/j.efsa.2011.2024 website: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2024.pdf>
- Ferrão, M. L. C. (2012). Percepção dos consumidores portugueses sobre os alimentos funcionais. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril, Portugal
- Figueira, M. E. (2010). Nutracêuticos na fronteira com os alimentos funcionais. In J. F. Pinto (Ed.), *Nutracêuticos e Alimentos Funcionais*. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Fontinha, C., & Correia, P. (2010). Amido resistente em diversas fontes não convencionais de amido. Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Viseu, p.67-81
- Franco, R. C. (2006). Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil
- Goñi, I., Garcia-Diz, L., Mañas, E., & Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistente starch: A method for foods and food products. *Food Chemistry*, Elsevier Science, vol. 56, nº 4, p.445-449

- Henry, C. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, Oxford Brookes University, Oxford, UK, 64, p.657-659
- Higgins, J. A. (2004). Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *J AOAC Int*, 87(3), 761-768
- Higgins, J. A. (2014). Resistant starch and energy balance: Impact on weight loss and maintenance, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:9, p.1158-1166
- Instituto Nacional de Estatística, I., & Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I. (2009). *Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006* Retrieved from <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/INS2005-2006.aspx>
- Jun, S. J., Lee, K. Y., Lee, S. & Lee, A. G. (2014). Physicochemical and rheological properties of starches substituted with type 4 resistant starch (cross-linked corn starch). *Starch/Stärke*, 66, p. 468-474
- Lobo, A. R., & Silva, G. M. L. (2003). Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Revista de Nutrição*, Campinas, 16(2): p.219-226
- Lopes, C., Oliveira, A., Santos, A. C., Ramos, E., Severo, M., & Barros, H. (2006). *Consumo alimentar no Porto* C. Lopes (Ed.) Retrieved from <http://higiene.med.up.pt/consumoalimentarporto/home.php?var=ficheiros>
- Martinho, C. A. C. (2011). Estudo sobre o conhecimento da população portuguesa acerca de fibras alimentares. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Viseu – Escola Superior Agrária de Viseu, Portugal
- Matsuda, L. Y. (2007). Concentração de amido resistente em pão francês pré-assado congelado: Aspectos tecnológicos. Dissertação de Mestrado, Politécnica da Universidade de São Paulo, Brasil

- Mattos, L. L., & Martins, I. S. (2000). Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Revista de Saúde Pública*, v.34, nº 1, p.50-55
- Maziarz, M., Sherrard, M., Juma, S., Prasad, C., Imrhan, V., & Vijayagopal, P. (2013). Sensory characteristics of high- amylose maize-resistant starch in three food products. *Food Science & Nutrition*, 1(2),p. 117-124
- Megazyme, (2014). Resistant starch: Assay procedure K-RSTAR 09/14. Megazyme International, Ireland, Retrieved from: www.megazyme.com
- Mendes, A. R. (2011). Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química – Universidade de Coimbra, Portugal
- Murphy, M. M., Douglass, J. J., & Birkett, A. (2008). Resistant starch intakes in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 108, nº 1, p.67-68
- NP-2966, 1986. Determinação do teor de água em pão. Derivados de Cereais.
- Nugent, A.P. (2005). Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation*, 30, p. 27-54
- Oliveira, H. S., & Cardoso, P. R. (s.d.). Atitudes e hábitos de consumo de alimentos funcionais: Um estudo exploratório. *Universidade Fernando Pessoa*, p. 83-94
- Pereira, K. D. (2007). Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 27 (supl), p.88-92
- Polesi, L. F. (2009). Amido resistente obtido a partir de amido de leguminosas e de seus hidrolisados. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Brasil
- Polesi, L. F. (2011). Amido resistente: Aplicações e métodos de produção. *B. CEPPA*, v.29, p. 211-222

- Rodríguez R, Jiménez A, Fernández- Bolaños J, Guillén R, Heredia A (2006) Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 3-15.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant starch – A review: Comprehensive reviews in food science and food safety, *Institute of Food Technology*, v. 5, p.1-17
- Salgado, S. M., Zelyta, P. F., Nonete, B, G, & Livera, A. V. S. (2005). Aspectos físico-químicos e fisiológicos do amido resistente. *B. CEPPA, Curitiba*, v. 23, nº 1, p.109-122
- Sanchez, D. B. O. (2009). Desempenho reológico e entálpico da massa de pão com amido resistente de milho e transglutaminase. *Dissertação de Mestrado, Politécnica de da Universidade de São Paulo, Brasil*
- Sanz-Penella, J.M. (2011). Resistant starch from modified pea starch creates a more nutritious bread. *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos Emerging Food R & D Report*, p.3
- Walter, M. (2005). Amido resistente: Metodologia de quantificação e resposta biológica em ratos. *Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria, Brasil*
- Walter, M., Silva, L. P., & Emanuelli, T. (2005). Amido resistente: Características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. *Ciência Rural*, v. 35, nº 4, Santa Maria
- Westenbrink, S., Brunt, K., & Kamp, J. V. (2013). Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry* 140, p. 562-567

- WHO. (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease - Technical Report Series 916 *Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*. Geneva: World Health Organization.
- Yadav, B. S. (2011). Effect of frying, baking and storage conditions on resistant starch content of foods. *British Food Journal*, 113(6-7), 710-719.
- Zaragoza, E. F., Navarrete, M. J. R., Zapata, E. S., & Álvarez, J. A. P. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International, Elsevier Science*, 43, p. 931-942
- Zaragoza, E. F., Zapata, E. S., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., López, J. F., & Alvarez, J. A. P. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/ Stärke*, 63, p. 406-415
- Zhang, Y., Zang, H., Wang, Y., Zeng, S., & Zheng, B. (2014). Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects. *Food Chemistry, Elsevier science*, 155, p. 311-318
- Zhou, Y., Meng, S., Chen, D., Zhu, X., & Yuan, H. (2014). Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. *Carbohydrate Polymers, Elsevier Science*, 103, p. 81-86